

明 細 書

木材の腐朽診断方法及び腐朽診断薬

5 技術分野

本発明は、木材の腐朽診断方法及びその方法に用いる木材の腐朽診断薬に関する。また、本発明は木材の簡易な腐朽診断方法及びその方法に用いる木材の腐朽診断キットに関する。

10 背景技術

木材は建築用材を中心に広範に使用されている優れた材料であるが、生物による劣化（生物劣化）を受けやすいという欠点がある。

- 木材の生物劣化は、シロアリ等の昆虫による食害と木材腐朽菌等の微生物による腐朽に大別される。前者は目視乃至簡単な検査で判別可能であるが、
- 15 後者は木材中での腐朽菌の生育によるため目視のみでは判別不可能な場合が多い。しかも腐朽菌の生育は、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等の構造物質の代謝分解を伴うため、一般に質量減少率として評価される木材の腐朽度が数%～10%程度で木材強度が半減する。特に褐色腐朽菌による木材の腐朽は建築用材に頻発するため、腐朽初期段階で木材の腐朽の有無を確
- 20 実に判定する方法が求められている。

- この問題に対処するためには、定期的に腐朽の有無をチェックすることが必要である。従来の腐朽検出方法は、(1) 木材の打診、触診、(2) 腐朽木材サンプルからの菌の培養、(3) 釘状の器具（ピロディン）を打ち込む際の抵抗による検出、(4) 超音波の伝達度の変化やアコースティックエミッション（AE）
- 25 を利用した検出等が考案されてきた。

しかし、(1) 木材の打診や触診では腐朽初期を検出できず、しかも判定が曖

昧である。(2) 菌の培養は結果を得るまでに長期間を要し、専門的な技術が必要である。(3) ピロディンはバネの力によりスチール製ピンを木材に打ち込み貫入深さから腐朽程度を判断するものであるが、供試木材の密度や品質に依存するため定量的な結果は得られず腐朽初期を検出できない。(4) 音波探傷や
5 アコースティックエミッション (AE) は大掛かりな装置を用いるためコストが掛かる上、専門知識と技術が必要である。このように、従来の腐朽検出方法にはいずれも問題があり、広く使用されるには至っていない。

そこで、抗原抗体反応を利用した検出方法も提案されている。

例えば、J. W. Palfreyman et al., "Immunological Methods for the Detection and
10 Characterisation of Wood Basidiomycetes", Biodeterior 7, 709-713 (1988) には、マツオウジ (Lentinus lepideus) やカワラタケ (Coriolus versicolor ; Trametes versicolor) を用いてその調製した抗血清により、菌の検出が可能であることが記載されている。この文献によれば、前記抗血清は Basidiomycetes 属の他の担子菌や一部の黴菌も検出できるとされている。しかし、抗血清に反応を示
15 した菌種名は記載されていない。また、対照 (菌を接種していない血清) に対しても種々の菌が反応したとされている。一般に腐朽が疑われる木材の表面にはカビ類を含む種々の菌が存在しており、これらにも反応する検出法では木材腐朽菌の検出法として有効でない。

C. A. Clausen et al., "Early detection of brown-rot decay in southern yellow pine
20 using immunodiagnostic procedures", Wood Sci. Technol. 26, 1-8 (1991) には、複数の腐朽菌由来の抗原を混合し、ウサギに接種して得た抗血清によりそれら複数の腐朽菌の検出が可能であることが示されている。しかし、この方法は複数の菌を培養する必要があるため操作が煩雑である。また、この文献では質量減少、酵素結合免疫吸着定量法 (ELISA法)、凝集法 (活性炭/ラテ
25 ックス) 及びドットプロット法について比較を行なっているが、凝集法では低腐朽度でも反応が見られる反面、高腐朽度でも陰性結果が得られるなど信

頼性が低い。E L I S A法では一部の腐朽菌を検出できず、ドットプロット法では全体に検出感度が低い。

また、Yoon Soo Kim et al., "The Use of ELISA for the Selection of White- and Brown-Rot Fungi", *Holzforschung* 45, 403-406 (1991) にも、腐朽菌で感作したウサギから得た抗血清を用いたE L I S A法を検討し、特定の腐朽菌を用いて得た抗血清に対しては当該菌種のみ強い反応を示すことが示されている。例外としてポスティア・プラセンタ (Postia placenta) に基づく抗血清に対しては他の菌も反応も示すが、その態様はE L I S A法の実施条件により変化する。なお、ポスティア・プラセンタ (Postia placenta) は日本では生息しない腐朽菌であり、侵入しないように規制措置が取られているため日本では利用できない。

米国特許第 5,563,040 号は、信頼性、非特異性に欠けていた従来法を考慮して、より確実な検出法を提案している。具体的には、ポリエステル布に捕捉ゾーンとキャリアーゾーンとを設け、捕捉ゾーンには腐朽菌抗原に特異的な第一の抗体（モノクローナル抗体）を固定し、キャリアーゾーンには腐朽菌抗原に対する第二の抗体（ポリクローナル抗体）を有色ビーズ上に固定しておく方法を開示している。試験に際しては、木材試料の抽出液にポリエステル布をキャリアーゾーン側を下にして浸漬する。抽出液中に腐朽菌抗原が存在する場合には、これが有色ビーズ上の第二抗体に結合し、毛管現象による液の上昇に伴い液中の抗原が第二抗体を有色ビーズとともに上方に引き上げ、捕捉ゾーンにおいて第一の抗体とさらに結合して第一の抗体－抗原－第二抗体（有色ビーズ）からなる複合体を形成する。このように有色ビーズが捕捉ゾーンに捕捉されて形成するラインを目視で確認し、腐朽菌の有無を判定するというものである。しかし、この文献では、ポスティア・プラセンタ (Postia placenta) 由来のキシラナーゼに対する抗体をモノクローナル抗体として用いた場合のみの効果が確認されている。しかし、日本・米国・欧州において典

型的な木材腐朽菌とされるオオウズラタケ、カワラタケ、ナミダタケに関する記載がなく、典型的な木材腐朽菌全般について検出できるとは言い難い。

このように、従来考案されている抗原抗体反応を利用した検出方法では、木材腐朽菌以外の菌を検出せずに多種にわたる木材腐朽菌を同時に検出する
5 という課題は解決されていない。

発明の開示

従って、本発明の課題は、木材腐朽菌全般について、多種にわたる木材腐朽菌による木材の腐朽を同時に検出し、かつ、木材腐朽菌以外を検出しない
10 木材腐朽の診断方法及びその方法に用いる診断薬を提供することにある。

本発明者らは、天然に存在するオオウズラタケ等の木材腐朽菌を培養して得られる分子量 1,000~100,000 のタンパク質を抗原として動物に感作することにより得られる抗体が、前記タンパク質を得るのに用いた木材腐朽菌のみならずそれ以外の木材腐朽菌によって腐朽した木材抽出液に対しても広く反応を示す一方、木材腐朽菌以外の菌が生育した木材抽出液には有意の反応を示さないという結果を得て、本発明を完成するに至った。
15

すなわち、本発明は、以下の木材の腐朽診断方法、これに用いる木材の腐朽診断薬、木材の簡易な腐朽診断方法及び木材の腐朽診断キットを提供する。

1. 木材腐朽菌を培養して得られる分子量 1,000~100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を、被検木材抽出液と接触させる抗原抗体反応により、被検木材の腐朽を判定する木材の腐朽診断方法。
20

2. 木材腐朽菌を液体培養して得られる分子量 1,000~100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を、被検木材抽出液と接触させる抗原抗体反応により、複数種の木材腐朽菌による被検木材の腐朽を判定する前記
25 1の木材の腐朽診断方法。

3. 前記タンパク質が、オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*)、キチリメン

- タケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum sepiarium) からなる群より選択される木材腐朽菌のうちの 1 種類の培養によって得られるものである前記 1 または 2 の木材の腐朽診断方法。
- 5 4. 前記タンパク質が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris) の培養によって得られるものである前記 3 の木材の腐朽診断方法。
5. オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum sepiarium)
- 10 からなる群より選択される 1 種または 2 種以上の木材腐朽菌による木材の腐朽を判定する前記 1 または 2 に記載の木材の腐朽診断方法。
6. 抗原抗体反応による判定がドットブロット法または酵素結合免疫吸着定量法 (E L I S A 法) により行なわれる前記 1 または 2 に記載の木材の腐朽診断方法。
- 15 7. スポット位置を指示または記録し得るように構成されたデバイス内に多孔性の膜を設けたドットブロット用基板を用意し、この基板のスポット位置に被検木材抽出液をスポットし、前記 6 に記載のドットブロット法により被検木材の腐敗を判定する木材の腐朽診断方法。
8. ドットブロット用基板に予め腐朽度既知の木材から得た標準試料をスポットしておき、この標準試料スポットとの比較により腐朽度を診断する前記
- 20 7 の木材の腐朽診断方法。
9. 木材腐朽菌を培養して得られる分子量 1,000~100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を含有し、被検木材から得た抽出液と接触させることにより木材中の木材腐朽菌による木材の腐朽を判定する木材の腐朽
- 25 診断薬。
10. 前記抗体が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ

- (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum sepiarium) からなる群より選択される 1 種類の木材腐朽菌を培養して得られた分子量 1,000~100,000 のタンパク質を動物に感作して得たものである前記 9
- 5 に記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 1. 前記抗体が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris) を培養して得られた分子量 1,000~100,000 のタンパク質を動物に感作して得たものである前記 1 0 に記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 2. 前記抗体が、木材腐朽菌を液体培地中 1 0~4 0℃の温度範囲での培養後、培養ろ液を限外ろ過またはゲルろ過して得られる分子量 1,000~100,000
- 10 のタンパク質を含む抗原溶液を用いて動物から得たものである前記 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 3. 抗体が抗血清として含有されている前記 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 15 1 4. 抗体が精製タンパク質として含有されている前記 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 5. 抗体がポリクローナル抗体として含有されている前記 1 4 に記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 6. 抗体がモノクローナル抗体として含有されている前記 9 乃至 1 1 のい
- 20 ずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 7. スポット位置を指示または記録し得るように構成されたデバイス内に多孔性の膜を設けたドットブロット用基板と、前記 9 乃至 1 6 のいずれかに記載の腐朽診断薬とを含む木材の腐朽診断キット。
- 1 8. ドットブロット用基板上に腐朽度既知の木材から得た標準試料をスポットしてある前記 1 7 に木材の腐朽診断キット。
- 25

(A) 木材の腐朽診断方法

本発明の木材の腐朽診断方法は、天然に存在する木材腐朽菌を液体培養して得た分子量 1,000~100,000 のタンパク質を抗原として動物に感作して得た抗体を、試験しようとする木材から得た抽出液と接触させることにより抗原抗体反応によって木材中の木材腐朽菌由来の代謝産物の有無や量を判定して

5 木材の腐朽（度）を診断するものである。

用い得る木材腐朽菌は、天然に存在する木材腐朽菌である。好適な木材腐朽菌の例としては、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum

10 sepiarium) が挙げられる。オオウズラタケが最も好ましい。

培養は液体培養により行なわれる。培地としては、種々の液体培地を用い得るが、特にセロビオースまたは上記菌による代謝によってセロビオースを生じ得るオリゴ糖もしくは多糖類、すなわち、 β -グルカンを主要炭素源として含有する培地が好ましい。培地中のセロビオース濃度は通常、0.01~10

15 質量%、好ましくは0.5~5質量%の範囲である。一般的には、この他に既知の任意の窒素源（硝酸アンモニウム等）、チアミン、ペプトンまたは場合によっては酵母エキスを含有させ、さらに、微量元素（K、Ca、Mg、B、Mn、Zn、Cu、Mo、Fe等）を添加する。

培養条件は上記の菌種の生育が可能な条件であればよいが、通常は10~40℃、好ましくは20~30℃の範囲で、5時間~6ヶ月、好ましくは1

20 週間~1ヶ月の間、振とう培養あるいは静置培養する。

培養後、培養ろ液から分子量範囲 1,000~1,000,000、好ましくは 5,000~100,000 を分画する。分画は、例えば限外ろ過膜またはゲルろ過によって行なうことができるが、これ以外でも上記分子量範囲をタンパク質の損傷なしに

25 分取できる方法であればよい。

得られたタンパクを抗原として用いて慣用の方法により動物を感作する。

感作時のタンパク質濃度は通常 0.01～100 mg/ml であり、好ましくは 0.1～10 mg/ml の範囲である。抗原を含む溶液の調製は、生物に悪影響を与えない任意の緩衝液が使用可能であるが、好ましくは PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）を用いることができる。

- 5 このようにして調製された抗原溶液は、アジュバントを適当な比（例えば、1：1）で混合して用いることができる。好適なアジュバントの例としては、結核菌由来のアジュバント（フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント）、RIBI アジュバント、百日咳アジュバント、無機アジュバント（アルミニウムアジュバント）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。もともと、タンパク質の分画分子量や被感作動物の種類によっては必ずしもアジュバントを用いる必要はない。
- 10

- 被感作動物の例としては、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、マウスなどの哺乳類、アヒル、ニワトリなどの鳥類が挙げられる。前記抗原溶液または抗原溶液とアジュバントとの混合液をこれらの動物の皮下あるいは
- 15 筋肉内に注入する。0.5～8 週間程度、好ましくは 1～3 週間の間隔を置いて 1～6 回程度の再感作を行なってもよい。通常は数週間程度経過した後、動物から血液を採取し、これを遠心分離に掛けて血清を分離する。例えば、最初の感作後 0.5～8 週間（好ましくは 1～3 週間）後に 2 回目の皮下注射を行ない、さらに 0.5～8 週間（好ましくは 1～3 週間）後に 3 回目の皮下注射を行ない、さらに 0.5～8 週間（好ましくは 1～3 週間）後に 4 回目の皮下注射を行ない、0.5～4 週間（好ましくは 1～3 週間）後に全採血を行なう。なお、ここに記載した免疫スケジュールはあくまでも一例であり、抗原に対して十分な免疫応答が認められる免疫スケジュールであればよい。
- 20

- 本発明では、この抗血清をそのまま用いることも可能であるが、必要に応じて、得られた抗血清をプロテイン A もしくは G カラム等のアフィニティカラムにより精製してもよい。また、慣用の方法により、モノクローナル抗体
- 25

を調製して用いてもよい。

なお、前述の C. A. Clausen et al. ("Early detection of brown-rot decay in southern yellow pine using immunodiagnostic procedures", Wood Sci. Technol. 26, 1-8 (1991)) は、複数の腐朽菌由来の抗原を混合し、ウサギに接種してそれぞれの抗体を混合物として得ているが、本発明方法では単一種の腐朽菌から得たタンパク質を接種して抗体を得るだけで典型的な腐朽菌の検出が可能である。

木材腐朽度の診断は、試験しようとする木材試料（被検木材試料）から得た抽出液と前記抗体とを接触させることにより行なう。被検木材試料としては、木材切断片、木材のドリル片、のこくず、木粉等、検査を行なう木材から採取した試料が挙げられる。こうした試料を以下の抽出用溶媒に浸漬等して抽出を行なう。抽出用溶媒は、水性溶媒、好ましくは、非イオン系界面活性剤等の界面活性剤、糖類、無機塩類等の浸透圧調整剤、無機塩類、有機酸の塩等の pH 調整剤等の 1 種以上を水に添加したものである。界面活性剤は特に限定されないが、タンパク質変性の少ないものが好ましく、例えば、トライトン X シリーズ（例えば、トライトン X-100）などが挙げられる。緩衝液としては、例えば、PBS（リン酸緩衝化食塩水）などが挙げられ、pH は 4～10、好ましくは pH 6～9 の範囲とする。抽出時間は任意の時間を設定可能であるが、好ましくは 1 分から 1 時間である。また抽出効率を向上させるために超音波処理あるいはホモジナイザー処理を併用することも有用である。

上記抗体溶液及び被検木材試料抽出液を用いて抗原抗体反応により木材の腐朽を判定する。このような判定は、酵素結合免疫吸着定量法（ELISA）、ドットプロット（Dot-Blot）またはイムノスポット、EIA、イムノクロマトグラフィー等を用い行なうことができるが、好ましくは ELISA 及びドットプロット法である。

本発明では、ELISA 及びドットプロットとして行なわれるすべての方

法を含むが、典型的には、抗体溶液を利用して標的抗原（木材腐朽菌抗原）を探索し、標識抗体（検出用抗体）を用いて試料中の標的抗原の有無を判定するものである。すなわち、まず、上述した抗体溶液と被検木材試料抽出液を接触させる。被検木材試料に腐朽菌が存在する場合には、抽出液中にその菌体または腐朽菌由来抗原が含まれるので、接触部で前記抗体と腐朽菌由来抗原の複合体が形成される。一方、抗体を得るのに用いた動物（例えば、ウサギ）に対する別の抗体（例えば、ヤギの抗ウサギ IgG 抗体）に適当なりポーター分子（酵素、蛍光体、発色試薬、放射性同位元素など）を結合した標識抗体を用意しておき、これをさらに作用させる。試料中に前記複合体が含まれる場合は、標識抗体がさらに結合して第 2 複合体が形成される。未結合の標識抗体を除去した後、酵素反応、蛍光、発色、放射能の有無や量を測定する。

用いる酵素（典型的にはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等）、発色試薬、放射性物質などは免疫学的検定法で慣用されており、本発明でも慣用法に従って製造するか、または市販品を用いることができる。

以下、ELISA について具体的な操作例を記載するが、下記の条件は代表的な範囲であって、これに限定されるものではない。

ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン等の樹脂製のマイクロタイタープレートに被検木材試料抽出液を一定量、例えば $100\mu\text{l}$ 添加する。 $0\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で、1 分～24 時間好ましくは 30 分～3 時間インキュベートする。マイクロタイタープレートを任意の濃度の界面活性剤（好ましくは 0.05% Tween20）を含む緩衝液（好ましくは PBS）での洗浄を 1～10 回好ましくは 2～3 回繰り返す（以下、同様の操作を「洗浄」と略す。）。次にブロッキング緩衝液（BSA（ウシ血清アルブミン）等の一般的なタンパク質を含む緩衝液好ましくは PBS）をマイクロタイタ

ープレートに加え、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間好ましくは30分～3時間インキュベートする。次いで、マイクロタイタープレートを洗浄する。

- 緩衝液、好ましくはPBSで希釈した抗体溶液を、マイクロタイタープレートに一定量例えば100 μ l 添加し、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間、好ましくは30分～3時間インキュベートする。マイクロタイタープレートを洗浄した後、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼあるいは β -ガラクトシダーゼ等の酵素を結合させたウサギ、ウマ、ヒツジ、モルモット、マウス等の哺乳類、好ましくはヤギの抗ウサギIgG
- 10 抗体溶液を一定量、例えば100 μ l マイクロタイタープレートに添加し、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間、好ましくは30分～3時間インキュベートする。マイクロタイタープレートを洗浄した後、用いた酵素の基質（検出用基質）溶液を一定量例えば100 μ l マイクロタイタープレートに加え、室温で0.1分～24時間好ましくは1～60分反応させ、分光光度計にて吸光度を測定する。検出用基質は、酵素との反応により
- 15 吸収波長が変化するもの（好ましくは水溶性の基質）であれば特に限定されず、ELISA法で慣用されているものでよい。例えば、用いた酵素がアルカリホスファターゼの場合pNPP（4-ニトロフェニルリン酸。前記アルカリホスファターゼの基質）を用いることができる。

- 20 ドットプロットも一般的な方法で可能であるが、以下に一例を記載する。

- セルロースあるいはニトロセルロース等のセルロース修飾体、ガラス、ナイロン、ポリエチレン、ポリエステル、PVDF（ポリビニリデンフルオライド）等からなる多孔性の膜状材料（以下膜と略す。）に被検木材試料抽出液を一定量、例えば10 μ l スポットする。0秒～1週間、好ましくは1分
- 25 ～10分間乾燥させる。膜を任意の濃度の界面活性剤（好ましくは0.05% Tween 20）を含む緩衝液（好ましくはPBS）にて1～10回、好ましく

は2～3回洗浄する（以下、同様の操作を「洗浄」と略す。）。

- 次にブロッキング緩衝液（B S A（ウシ血清アルブミン）等の一般的なタンパク質を含む緩衝液、好ましくはP B S）に膜を浸し、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間、好ましくは30分～3時間インキュベートする。膜を洗浄する。緩衝液好ましくはP B Sで希釈した抗体溶液に膜を浸し、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間、好ましくは30分～3時間インキュベートする。膜を洗浄する。アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼあるいは β -ガラクトシダーゼ等の酵素を結合させたウサギ、ウマ、ヒツジ、モルモット、マウス等の哺乳類、好ましくはヤギの抗ウサギIgG抗体溶液に膜を浸し、0～50℃、好ましくは30～40℃で、1分～24時間、好ましくは30分～3時間インキュベートする。膜を洗浄する。用いた酵素の基質（検出用基質）溶液に膜を浸し、室温で0.1分～24時間、好ましくは1～60分反応させ、膜上のスポット部位における呈色を観察する。検出用基質は、酵素との反応により吸収波長が変化し、水溶解度が低下する基質であれば特に限定されず、ドットプロット法で慣用されているものでよい。例えば、用いた酵素がアルカリホスファターゼの場合BCIP/NBT（アルカリ性ホスファターゼ活性染色プレミックス基質）を用いることができる。

（B）木材の腐朽診断薬

- このように、天然に存在する木材腐朽菌を液体培養して得た分子量1,000～100,000、好ましくは5,000～100,000のタンパク質を抗原として動物に感作して得た抗血清または精製タンパク質、ポリクローナル抗体は、上述のように、被感作（免疫）動物に対する適当な検出用抗体と組み合わせて木材腐朽度の診断薬として利用できる。
- また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の場合には、これをスチレンビーズ等に固定して凝集の有無による診断用製品とすることもできる。

(C) 木材の腐朽度の簡易診断方法及び簡易診断用キット

本発明の木材の腐朽診断は、以下のような診断用基板と組み合わせてより簡便かつ確実にこなうことができる。

- すなわち、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン等の樹脂製の板
- 5 に幅 0.5～10 cm、長さ 1～50 cm、深さ 0.1～10 cm、より好ましくは幅 1～5 cm、長さ 5～20 cm、深さ 0.5～2 cm の溝を設けたものを用意する。溝が底を有する有底枠体（容器状）でも底を有しない無底の枠体でもよい（以下、デバイスと言う。）。セルロースあるいはニトロセルロース等のセルロース修飾体、ガラス、ナイロン、ポリエチレン、ポリエステル、
- 10 P V D F 等から成る多孔性の膜状の材料（以下、膜と略する）をデバイスの溝に収まるように切断し、デバイスの溝に設置する。この時、スポットされる部分を除く膜の少なくとも 1 箇所をデバイスの溝面内に接着することで、その後の作業が円滑に行なえる。

木材腐朽度の診断に際しては、上記デバイスを基板として試験を行なう。

- 15 すなわち、先に述べた「木材の腐朽診断方法」に従って、家屋等の木材建築物の腐朽が疑われる部位から数箇所（例えば 5 箇所）から被検木材試料を採取し、それぞれの被検木材抽出液を得る。この 5 箇所の被検木材抽出液をデバイスの溝に収まった膜にスポットし、以下、先に述べたドットプロットの方法に従って腐朽判定を行なう。
- 20 この場合、膜上に適正な間隔を空けてスポットを滴下させ、スポット部位における呈色を観察しやすいように、デバイスのスポット部位に対応して枠の形状を設計することができる。例えば、デバイスの溝を挟む枠部分に目盛りやダイヤマーク等を設けて所定のスポット数に応じた最適間隔でのスポットティングを促すとともに、試料番号との対応を筆記できるようなスペースを
- 25 設ける。このようにすることで、膜のどの位置にスポットがなされているか、それぞれのスポットがどの試料に対応するかが明確にわかり、1 枚のデバイ

5 スで複数の試料を同時かつ確実に検査できる。また、基板または膜上に腐朽
度既知の試料から得た標準スポットを設けておくことが好ましい。すなわち、
木材腐朽菌による腐朽の有無はスポットの呈色により判断できるが、腐朽度
既知の試料を予めスポットしておくことにより、被検木材から得た試料によ
10 るスポットとこの標準試料スポットとで吸光度（肉眼観察の場合は濃度）を
比較して、腐朽の程度を定量的に評価できる。標準スポットは、一般に質量
減少等から腐朽度が判明している木材（例えば、質量減少率1%、3%、5%、
7%、10%等の木材）から得た標準試料をスポットすることにより設ける
ことができる。標準試料スポットは1つでもよいし、腐朽度の異なる複数の
15 スポットでもよい。

さらに、前記デバイスを、円形、楕円形、矩形等の開口部を設けたカバー
プレートと前述のように溝内に膜を設けた基板との組み合わせとしてもよい。
カバープレートの幅は溝の幅とほぼ同じとし、溝内に嵌合するようにする。
スポッティングを行なう際にはカバープレートで膜を覆って開口部内に抽出
15 液をスポットする。洗浄等の際にはカバープレートを外し、最終判定時には
再びカバープレートを被せる。この場合もカバープレートの開口部に番号を
刻印しておくか、試料番号との対応を筆記できるようなスペースを設けてお
けば、それぞれのスポットがどの試料に対応するかが明確にわかる。

本発明の診断薬及び診断方法は、種々の木材に対して有効である。本発明
20 の診断薬及び診断方法が適用できる木材としては、アカマツ、カラマツなど
のマツ類およびスギ、ペイツガ、ヒノキなどが挙げられる。また、判定可能
な木材腐朽菌としては、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメン
タケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ
(Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ
25 (Gloeophyllum sepiarium) などが挙げられる。

本発明によれば、典型的な木材腐朽菌による木材の腐朽の有無を短時間で

- 簡単に判定できる。本発明方法は木材腐朽菌による木材の腐朽を特異的に判定可能であり、表面在住菌およびその代謝産物には反応しないため誤診断のおそれが極めて低い。また、本発明の木材腐朽菌の診断薬は、単一種の木材腐朽菌を動物に感作させて得られるため、製造が容易であるとともに、均一な製品の供給が容易である。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2 による菌種ごとの吸光度変化を示すグラフである。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例及び比較例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1：抗体の作成

(1) 抗原の調製

- 15 1%セロビオース、0.2% NH_4NO_3 、0.2% KH_2PO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.57ppm H_3BO_3 、0.036ppm $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.31ppm $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.039ppm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.018ppm $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.015ppm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1ppmチアミン塩酸塩、0.5%ペプトン、0.05%酵母エキスを含む液体培地 (pH5.5) 50ml を 500ml 容培養フラスコに入れ、綿栓をし、オートクレーブ滅菌 (121℃、30分) を行なった。

- この培地にオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris* (Berk. Et Curt.) Gilbn.& Ryv. FFPRI 0507) を接種し、27℃で2週間静置培養し、得られた培養液をガラスフィルターにてろ過し培養ろ液を得た。培養ろ液を限外ろ過膜 (Ultrafree-15, 25 バイオマックス 100 メンブレン装着ユニット、ミリポア社製) でろ過し、分子量 100,000 以下の画分を得た。この画分を限外ろ過膜 (Ultrafree-15, バイオ

マックス 5 メンブレン装着ユニット、ミリポア社製) で濃縮後、等量の P B S で 3 回洗浄し、分子量 5,000~100,000 の画分を得た。得られた画分を P B S で希釈してタンパク質濃度約 0.7mg/ml とし、この溶液を抗原溶液とした。

(2) ポリクローナル抗体の調製

- 5 (1) で得られた抗原溶液を用いてポリクローナル抗体の調製を行なった。抗原溶液にフロイントの完全アジュバントを 1 : 1 に混合した。これをウサギの皮下、10箇所注射した。2週間後、再度皮下注射をおこなった。さらに2週間後、再度皮下注射を行なった。さらに2週間後、再度皮下注射を行なった。1週間後全採血を行なった。全血を30分放置後、遠心分離により抗血清を分離した。得られた抗血清をプロテインAアフィニティカラム
- 10 (Protein A Kit, SIGMA 社製) により精製してポリクローナル抗体溶液を得た。

実施例 2 : E L I S A 法による検定

(1) 腐朽木片及び腐朽木片抽出液の調製

- 15 培養基としてスギ辺材 10 個及び純水 20 ml を 500 ml 容三角フラスコに入れ、綿栓した後、オートクレーブ滅菌 (121℃、30分) した。

- この三角フラスコを 7 本用意し、木材腐朽菌であるオオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor) 及び木材表面汚染菌であるペニシリウム・フニコロスム (Penicillium funiculosum; J I S かび抵抗性試験用菌株)、グリオクラジウム・ビレンス (Gliocladium virens Miller; J I S かび抵抗性試験用菌株、旧名 Trichoderma viride) の 7 種類の菌株をそれぞれ接種し 24℃で 4 週間保温した。
- 20

- 4 週間後、腐朽した木片から、手動ドリルを用いて小木片状の木材試料を
- 25 採取し、この木材試料 1 g 当り、0.1% T r i t o n X-100 を含む P B S (p H 7.4) 5 ml を添加し、10分間放置することにより、被検木片から

の抽出液を得た。

(2) E L I S A法による木材腐朽判定

ポリスチレンで出来たマイクロタイタープレート (NUNC-IMMUNO PLATE, ナルジェヌンクインターナショナル社製) に各被検木材試料抽出液及び対照

5 (抽出液のみ) を $100\mu\text{l}$ 添加した。

プレートを 37°C で1時間インキュベートした。次いで、マイクロタイタープレートを 0.05% T w e e n 2 0 を含む P B S で2回洗浄 (以下、この操作を単に「洗浄」という。) した。次にブロッキング緩衝液 (1% B S A、 0.05% T w e e n 2 0 を含む P B S) をマイクロタイタープレートに $100\mu\text{l}$ 加え、
10 37°C で1時間インキュベートした。次いで、マイクロタイタープレートを洗浄した。

(2) で取得した抗体溶液を P B S で希釈し、マイクロタイタープレートに $100\mu\text{l}$ 添加し、1時間インキュベートした。次いで、マイクロタイタープレートを洗浄した。アルカリホスファターゼを結合させたヤギの抗ウサギ I g G 抗体溶液 (SIGMA 社製) を $100\mu\text{l}$ マイクロタイタープレートに
15 添加し、 37°C で1時間インキュベートした。次いで、マイクロタイタープレートを洗浄した。 0.1% p N P P (4-ニトロフェニルリン酸) 溶液を $100\mu\text{l}$ マイクロタイタープレートに加え、室温で30分反応させ、分光光度計にて 405nm の吸光度を測定した結果を図1に示す。

20 その結果、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor) については有意な吸光度変化が観察されたが、ペニシリウム・フニコロスム (Penicillium funiculosum) とグリオクラジウム・ビレンス (Gliocladium virens Miller) では対照と比べ有意の
25 吸光度変化は認められなかった。

本発明で提案した抗体を用いた E L I S A により、典型的な5種の木材腐

朽菌で腐朽した木材を検出できること、この方法は木材腐朽菌以外の表面汚染菌を検出せず、木材腐朽菌による木材の腐朽に特異的な検出方法であることが明らかとなった。

5 実施例 3：ドットブロット法による木材腐朽判定

木材抽出液は実施例 2 と同様にして調製し、ニトロセルロース膜（ニトロセルロースメンブレン 0.45 μ m、BIO-RAD 社製、以下「膜」と略す。）に被検木材試料抽出液を 10 μ l 及び対照をスポットした。この膜を 10 分間乾燥させた。膜を 0.05% Tween 20 を含む PBS にて 2 回洗浄した（以下、この操作を単に「洗浄」という。）。次にブロッキング緩衝液（1% BSA、0.05% Tween 20 を含む PBS）に膜を浸し、37℃で 10 分間インキュベートした。次いで、膜を洗浄した。

（2）で取得した抗体溶液を PBS で希釈し、膜を浸し、37℃で 10 分間インキュベートした。膜を洗浄した後、アルカリホスファターゼを結合させたヤギの抗ウサギ IgG 抗体溶液（SIGMA 社製）に膜を浸し、37℃で、10 分間インキュベートした。膜を洗浄した後、BCIP/NBT 溶液（AP 発色キット、BIO-RAD 社製）に膜を浸し、室温で 10 分間反応させ、膜上のスポット部位における呈色を観察した。結果を表 1 に示す。

表 1

| 菌種 | 呈色 |
|-------------|----|
| オオウズラタケ | ◎ |
| キチリメンタケ | ◎ |
| イドタケ | ◎ |
| カワラタケ | ◎ |
| ナミダタケ | ◎ |
| Gliocladium | × |
| Penicillium | × |

◎：顕著な呈色
 ×：有意な呈色なし

表 1 に示すように、本発明で提案した抗体を用いたドットプロットにより、典型的な 5 種の木材腐朽菌で腐朽した木材を検出できること、この方法は木材腐朽菌以外の表面汚染菌（ペニシリウム・フニクロスム及びグリオクラジウム・ビレンス）を検出せず、木材腐朽菌による木材の腐朽に特異的な検出方法であることが明らかとなった。またドットプロット法では、より迅速に被検木材の腐朽判定が行なえることが明らかとなった。さらに、標準試料スポットを設けた測定キット／方法を用いれば、より信頼度が高く定量的な木材腐朽度の診断を容易に行なうことができ極めて有用である。

10

産業上の利用可能性

本発明の木材腐朽診断薬は、オオウズラタケ等の褐色腐朽菌だけでなくカワラタケ等の白色腐朽菌による木材腐朽に対しても明確な反応を示すため、建築材、保存木材などにおける腐朽度の判定に有用である。また、本発明の木材腐朽菌の診断薬は、単一種の木材腐朽菌を動物に感作させることにより得ているため、製造が容易であるとともに、均一な製品の供給が容易であり、建材一般に対して広く利用できる。

15

請 求 の 範 囲

1. 木材腐朽菌を培養して得られる分子量 1,000～100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を、被検木材抽出液と接触させる抗原抗体
5 反応により、被検木材の腐朽を判定する木材の腐朽診断方法。
2. 木材腐朽菌を液体培養して得られる分子量 1,000～100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を、被検木材抽出液と接触させる抗原抗体反応により、複数種の木材腐朽菌による被検木材の腐朽を判定する請求
10 の範囲 1 の木材の腐朽診断方法。
3. 前記タンパク質が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ
15 (Gloeophyllum sepiarium) からなる群より選択される木材腐朽菌のうちの 1 種類の培養によって得られるものである請求の範囲 1 または 2 の木材の腐朽診断方法。
4. 前記タンパク質が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris) の培養によって
20 得られるものである請求の範囲 3 の木材の腐朽診断方法。
5. オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum sepiarium)
25 からなる群より選択される 1 種または 2 種以上の木材腐朽菌による木材の腐朽を判定する請求の範囲 1 または 2 に記載の木材の腐朽診断方法。

6. 抗原抗体反応による判定がドットプロット法または酵素結合免疫吸着定量法（E L I S A法）により行なわれる請求の範囲 1 または 2 に記載の木材の腐朽診断方法。

5

7. スポット位置を指示または記録し得るように構成されたデバイス内に多孔性の膜を設けたドットプロット用基板を用意し、この基板のスポット位置に被検木材抽出液をスポットし、請求の範囲 6 に記載のドットプロット法により被検木材の腐敗を判定する木材の腐朽診断方法。

10

8. ドットプロット用基板に予め腐朽度既知の木材から得た標準試料をスポットしておき、この標準試料スポットとの比較により腐朽度を診断する請求の範囲 7 の木材の腐朽診断方法。

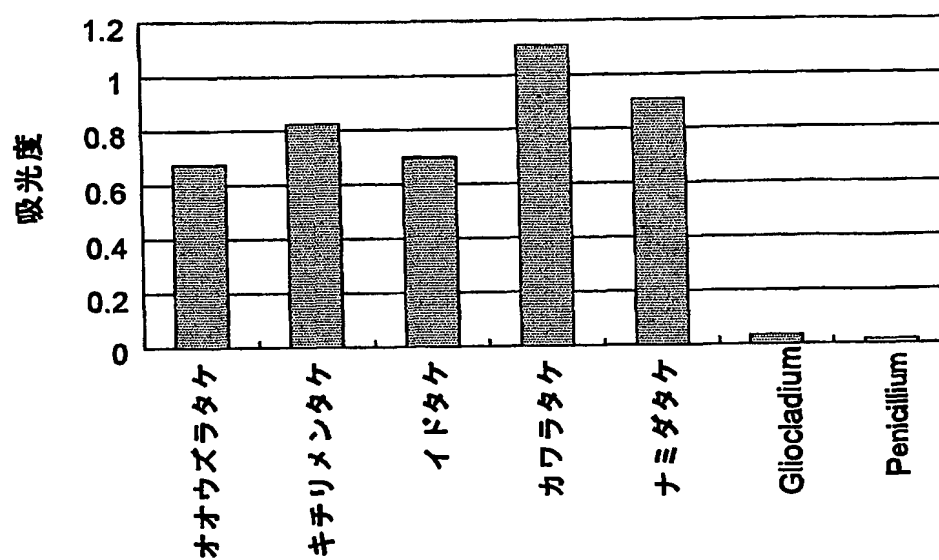
15 9. 木材腐朽菌を培養して得られる分子量 1,000～100,000 のタンパク質を抗原として動物を感作して得た抗体を含有し、被検木材から得た抽出液と接触させることにより木材中の木材腐朽菌による木材の腐朽を判定する木材の腐朽診断薬。

20 10. 前記抗体が、オオウズラタケ (Fomitopsis palustris)、キチリメンタケ (Gloeophyllum trabeum)、イドタケ (Coniophora puteana)、ナミダタケ (Serpula lacrymans)、カワラタケ (Trametes versicolor)、キカイガラタケ (Gloeophyllum sepiarium) からなる群より選択される 1 種類の木材腐朽菌を培養して得られた分子量 1,000～100,000 のタンパク質を動物に感作して得たものである請求の
25 範囲 9 に記載の木材の腐朽診断薬。

- 1 1. 前記抗体が、オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) を培養して得られた分子量 1,000~100,000 のタンパク質を動物に感作して得たものである請求の範囲 1 0 に記載の木材の腐朽診断薬。
- 5 1 2. 前記抗体が、木材腐朽菌を液体培地中 1 0 ~ 4 0 °C の温度範囲での培養後、培養ろ液を限外ろ過またはゲルろ過して得られる分子量 1,000~100,000 のタンパク質を含む抗原溶液を用いて動物から得たものである請求の範囲 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 10 1 3. 抗体が抗血清として含有されている請求の範囲 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 4. 抗体が精製タンパク質として含有されている請求の範囲 9 乃至 1 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 15 1 5. 抗体がポリクローナル抗体として含有されている請求の範囲 1 4 に記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 6. 抗体がモノクローナル抗体として含有されている請求の範囲 9 乃至 1
- 20 1 のいずれかに記載の木材の腐朽診断薬。
- 1 7. スポット位置を指示または記録し得るように構成されたデバイス内に多孔性の膜を設けたドットプロット用基板と、請求の範囲 9 乃至 1 6 のいずれかに記載の腐朽診断薬とを含む木材の腐朽診断キット。
- 25 1 8. ドットプロット用基板上に腐朽度既知の木材から得た標準試料をスポ

ットしてある請求の範囲 1 7 に木材の腐朽診断キット。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2004 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2004 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2004 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | HIRANO et al., "Immunogold Labeling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown-rot fungus Tyromyces palustris", J.Wood Sci, Vol.46(2000), pages 45 to 51 | 1-18 |
| Y | CLAUSEN, "Detecting Decay Fungi with Antibody-Based Tests and Immunoassays", ACS Symposium Series, Vol.845(April, 2003), pages 325 to 336; page 330, column of "Dot Blot Immunoassay"; page 325 | 1-18 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July, 2004 (12.07.04)

Date of mailing of the international search report

03 August, 2004 (03.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/46

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JICST (JOIS), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | HIRANO ET AL. "Immunogold Labeling of an extracellular substance producing hydroxyl radicals in wood degraded by brown-rot fungus <i>Tyromyces palustris</i> " J Wood Sci, Vol. 46 (2000) p. 45-51 | 1-18 |
| Y | CLAUSEN "Detecting Decay Fungi with Antibody-Based Tests and Immunoassays" ACS Symposium Series Vol. 845 (April 2003) p. 325-336 第330頁 Dot Blot Immunoassayの欄及び第325頁 | 1-18 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.07.2004

国際調査報告の発送日

03.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.